

UNIVERSITES MONTPELLIER II ET MONTPELLIER I
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

MASTER RECHERCHE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

MENTION BIOLOGIE SANTE
SPECIALITE : NUTRITION, AGROVALORISATION EN SANTE PUBLIQUE

**CARACTERISATION DE DEUX SOUCHES DE *LACTOBACILLUS SAKAI* UTILISEES
DANS LA FERMENTATION DES PRODUITS CARNES**

par

Ratisbonne-Zafimahova Kemba Andréa

Présenté le 9 Septembre 2009 devant le Jury de la Commission d'Examen du parcours Nutrition

Président : Professeur B.Caporiccio

Travail réalisé sous la direction de Elodie Arnaud
Gérard Loiseau
Antoine Collignan

Laboratoire d'accueil : Cirad, UMR Qualisud, Département Persyst

UNIVERSITES MONTPELLIERII ET MONTPELLIER I
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

MASTER RECHERCHE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

MENTION BIOLOGIE SANTE
SPECIALITE : NUTRITION, AGROVALORISATION EN SANTE PUBLIQUE

**CARACTERISATION DE DEUX SOUCHES DE *LACTOBACILLUS SAKAI* UTILISEES
DANS LA FERMENTATION DES PRODUITS CARNES**

par

Ratisbonne-Zafimahova Kemba Andréa

Présenté le 9 Septembre 2009 devant le Jury de la Commission d'Examen du parcours Nutrition

Président : Professeur B.Caporiccio

Travail réalisé sous la direction de Elodie Arnaud
Gérard Loiseau
Antoine Collignan

Laboratoire d'accueil : Cirad, UMR Qualisud, Département Persyst

REMERCIEMENTS

Ce stage de recherche a été réalisé à l'UMR Qualisud, du Department Persyst au Cirad Montpellier. Je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation.

Je remercie B. Caporiccio, Professeur à l'Université Montpellier 2 pour m'avoir permis de suivre la formation de Master 2 Nutrition, et M. Reynes, Directeur de l'UMR Qualisud, de m'avoir accueillie au sein de cette UMR.

J'adresse ma profonde gratitude à G. Loiseau qui m'a encadrée avec patience durant ce stage, à A. Collignan pour ses précieux remarques et conseils et à E. Arnaud qui a suivi ce travail de l'île de La Réunion. J'ai pu approfondir mes connaissances dans le domaine de la microbiologie, les procédés traditionnels de conservation de la viande et les plans d'expériences. J'ai aussi beaucoup apprécié de réviser mes cours de maths et biochimie. Merci également d'avoir consacré beaucoup de votre temps pour la correction de cet ouvrage.

Je remercie également I. Piro-Metayer, D. Dijoux, J. Ricci qui m'ont aidé à réaliser les manipulations expérimentales, et M. Zilmia qui a bien voulu réalisé quelques opérations de dosage au Cirad La Réunion.

Merci également à T. Goli pour son aide et merci à tous les amis rencontrés au cours de ce stage au Cirad.

Merci à tous le personnel du Cirad pour son accueil chaleureux.

Enfin, mes remerciements s'adressent à mon mari et ma famille pour leur soutien.

*Je bénirais l'Eternel en tout temps.
Sa louange sera toujours dans ma bouche...*

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX.....	i
LISTE DES FIGURES.....	i
INDEX DES ABREVIATIONS	i
INTRODUCTION GENERALE.....	1
Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Les bactéries lactiques.....	3
1.1. Métabolisme énergétique des bactéries lactiques.....	3
1.2. Autres voies métaboliques	4
1.3. Formation des isomères du lactate	4
1.4. Facteurs agissant sur la croissance et le métabolisme des bactéries lactiques	5
1.4.1. Influence des substrats carbonés et énergétiques	5
1.4.2. Température	5
1.4.3. pH.....	5
1.4.4. Oxygène	6
1.4.5. Activité de l'eau	6
1.4.6. Autres facteurs.....	7
2. <i>Lactobacillus sakei</i>	7
3. Caractérisation des souches de <i>Lactobacillus sakei</i>	8
3.1. Critères de caractérisation des bactéries lactiques	8
Partie 2 : MATERIELS ET METHODES	9
1. Isolement des souches de <i>Lb. sakei</i>	9
2. Identification des souches de <i>Lb. sakei</i>	9
2.1. La coloration de Gram.....	9
2.2. Le test catalase	9
2.3. Le test oxydase	9
2.4. La galerie API 50 CH.....	9
2.5. La galerie enzymatique API ZYM	10
3. Etude de la croissance et du métabolisme de <i>Lb sakei</i> (Texel et Tradi)	10
3.1. Etude de la croissance	10
3.1.1. Le milieu de croissance	10
3.1.2. Les cinétiques de croissance	10
3.1.3. Mesure du pH et de l'acidité titrable.....	11
3.2. Etude du métabolisme de <i>Lb sakei</i>	11
3.2.1. Dosage de l'acide lactique.....	11
3.2.2. Dosage de l'acide acétique.....	11
3.2.3. Dosage de l'éthanol.....	12
3.2.4. Dosage des glucides G1 à G7.....	12
3.2.5. Dosage du lactose.....	13
4. Etude des effets du pH, de la concentration en NaCl, de la concentration en acide lactique et de l'activité de l'eau sur la croissance de <i>Lb sakei</i>	13
4.1. Principe du réseau uniforme de Doelhart.....	13
4.2. Domaine expérimental	14
4.3. Préparation des milieux de culture	14
4.4. Suivi de la croissance	14
4.5. Analyse des données	14
Partie 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS	15
1. Identification des souches isolées des ferments Texel et Tradi	15
1.1. La coloration de Gram.....	15
1.2. Tests catalase et oxydase.....	15

1.3. Galerie API 50 CH	16
1.4. Test API ZYM.....	17
2. Etude de la croissance et du métabolisme de <i>Lb sakei</i> (Texel et Tradi)	18
2.1. Cinétique de croissance.....	18
2.2. Métabolisme de <i>Lb sakei</i> tradi et <i>Lb sakei</i> Texel dans le syam à 30 °C	21
3. Effet du pH, de la concentration en NaCl, de la concentration en acide lactique et de l'activité de l'eau sur la croissance de <i>Lb sakei</i>	22
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	27
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	28
RESUMÉ.....	31
ABSTRACT	32

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Domaine expérimental et niveau de distribution des variables pour la détermination des effets du pH, de [NaCl], de [AL] et de l'Aw sur le taux de croissance de <i>Lb sakei</i>	14
Tableau 2 : Résultats des tests catalase et oxydase des bacilles isolés des ferments Texel et Tradi 313.	15
Tableau 3: Résultats de la galerie API 50 CH des lactobacilles isolés des ferments Texel et Tradi 313	16
Tableau 4: Résultats du test APIZYM réalisé sur les souches isolées des ferments Tradi 313 et Texel.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 5 : Isomères de l'acide lactique formés par les souches <i>Lb sakei</i> Texel et <i>Lb sakei</i> Tradi lors de la fermentation de glucose, lactose, maltose et DE21.	21
Tableau 6: Valeurs codées des facteurs et réponses.....	24
Tableau 7: Significativité des effets des facteurs et de leurs interactions.....	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma de la fermentation homolactique et hétérolactique (Roissart and Luquet 1994).....	3
Figure 2: Vue en microscopie à balayage de <i>Lb sakei</i> 23K (Champomier et al. 1987).....	7
Figure 3: Photos des colorations de Gram réalisées sur les souches isolées de (a) Ferment Tradi 313 et (b). Ferment Texel.	15
Figure 4: Courbe de croissance sur milieu SYAM non renouvelé à 30°C de la souche isolées du ferment Texel (a) et du ferment Tradi313 (b). Les différentes phases sont indiquées par 1 (latence), 2 (phase exponentielle), 3 phase de ralentissement et 4 (phase stationnaire)	19
Figure 5: Courbe de croissance sur milieu SYAM non renouvelé à 30 °C de la souche isolée du ferment Tradi313 (a) et du ferment Texel (b) inoculées après préculture sur milieu SYAM.	19
Figure 6: Evolution du pH et de l'acidité titrable lors de la croissance sur milieu SYAM non renouvelé à 30°C des souches isolées des ferments Tradi 313 et Texel inoculées après préculture sur le milieu SYAM.	20
Figure 7: Quantité d'acide lactique (D et L), d'éthanol et d'acide acétique produite lors du catabolisme du glucose, du lactose, du maltose et du DE 21 par la souche Tradi et la souche Texel, après 48 h de fermentation	21
Figure 8: Pourcentage de sucre consommé après 48h de fermentation par <i>Lb sakei</i> sur différents substrats.....	22
Figure 9: Effet d'interaction entre pH-[AL] pour <i>Lb sakei</i> Tradi.....	26

INDEX DES ABREVIATIONS

ATP	Adénosine triphosphate
DII	Déshydratation par Imprégnation Immersion

DGCCRF	Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
LDH	Lactate déshydrogénase
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
OMS	Organisation Mondiale de la santé

INTRODUCTION GENERALE

La viande est une denrée périssable aussi sa conservation dans les pays tropicaux est difficile, surtout due au manque de structures adéquates pour sa conservation au froid et des conditions climatiques qui favorisent sa dégradation. Les procédés traditionnels forts anciens de transformation de la viande dans les pays du sud sont le plus souvent le salage, le séchage, le fumage, et la fermentation. Ces procédés peuvent être combinés et conduisent à la production de viandes séchées, de viandes salées/séchées et de viandes séchées/fumées. Le salage et le séchage qui sont les deux procédés les plus anciennement connus pour la conservation des aliments ont conduit empiriquement à la production de viande séchée/salée/fermentée. Du reste, de nombreuses études récentes montrent que des produits traditionnels salés séchés pouvaient, lorsque ces deux opérations étaient mal maîtrisées, connaître aussi une étape de fermentation.

La fermentation qui intervient alors est la fermentation lactique. Elle est due à la présence naturelle de bactéries lactiques sur la viande ou présentes dans l'environnement, mais aussi à des bactéries sélectionnées et apportées sous forme de starter pour les productions mieux maîtrisées. La principale transformation qui intervient pendant la fermentation est l'acidification de la viande par la production d'acide lactique, et selon l'espèce bactérienne incriminée, de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO₂, en catabolisant les sucres présents dans la viande. C'est essentiellement la production d'acides organiques qui est responsable de la stabilisation microbiologique des viandes fermentées. Les flores négatives qui sont soit responsables de l'altération de la viande (putréfaction), soit pathogènes pour l'homme sont inhibées par des valeurs de pH inférieures à 4.5 et par les acides lactique et acétique qui ont des propriétés antimicrobiennes par eux même. A ces effets, il faut ajouter que certaines souches de bactéries lactiques synthétisent du peroxyde d'hydrogène et/ou des bactériocines fortement antimicrobiens et que les flores lactiques colonisent rapidement l'environnement en consommant les substrats fermentescibles qui pourraient permettre la croissance des flores négatives.

Les conditions favorables au développement de la flore lactique afin d'éviter la croissance des germes indésirables en cours de fabrication mais aussi lors du séchage qui lui succède sont rarement rencontrées dans les pays tropicaux trop chauds et trop humides. Ceci explique que l'on retrouve peu de produits carnés tropicaux fermentés/séchés.

L'UMR Qualisud au sein du département PERSYST du CIRAD cherche à adapter le procédé de fermentation/séchage aux conditions tropicales, permettant ainsi d'améliorer la qualité des produits fermentés/séchés (ou susceptibles de l'être) et d'ouvrir une nouvelle voie de valorisation de la viande en milieu tropical. La solution innovante envisagée consiste à préstabiliser par déshydratation et à formuler rapidement la viande avant fermentation par immersion en solution concentrée en particulier en glucides. A l'issue de ce prétraitement, les teneurs en glucides fermentescibles de la viande seraient suffisantes pour permettre un bon déroulement de la fermentation lactique. Pour résumer, il est envisagé de coupler un traitement de déshydratation imprégnation par immersion et une étape de fermentation.

La déshydratation imprégnation par immersion, largement étudiées au CIRAD, consiste à mettre la viande en contact avec une solution fortement concentrée afin de la déshydrater et de l'imprégner simultanément (Collignan and Raoult-Wack 1992). L'immersion en solution ternaire eau-sel-glucides permet d'éviter le séquençage des opérations de salage et de séchage. L'utilisation de sirop de glucose (amidon partiellement hydrolysé) induit une bonne déshydratation, tout en limitant le salage du produit. Les deux

paramètres importants sont une activité de l'eau (a_w) faible et une teneur en NaCl qui inhibent la croissance des flores négatives.

Si les flores lactiques impliquées et leur cinétique de fermentation (croissance des populations microbiennes, et vitesse de consommation des sucres et d'acidification) sont relativement bien connue par exemple pour la fermentation du saucisson sec, très peu de travaux font état de la possibilité de fermenter une viande notamment lorsque celle-ci a préalablement subi une première étape de salage-séchage. En effet, les flores lactiques les plus utilisées appartiennent à l'espèce *Lactobacillus sakei* dont la croissance peut être inhibée par des teneurs en sel trop élevées couplées à une activité de l'eau (a_w) trop basse. Les travaux récents réalisés par le CIRAD montrent qu'après un abaissement de la teneur en eau de la viande de 75 à 65 %, la fermentation lactique reste possible (Quaranta 2007).

L'intérêt de ce couplage est que la DII permet de préstabiliser rapidement la viande en abaissant l'activité de l'eau par déshydratation osmotique à une valeur voisine de 0.9, en salant la viande et à maintenir dans la viande des quantités de sucres fermentescibles nécessaires au bon déroulement de la fermentation lactique. La fermentation qui s'ensuit permettra d'améliorer non seulement la qualité sanitaire en abaissant la valeur du pH autour de 5 et en produisant des acides organiques et autres composés antimicrobiens capables d'inhiber le développement des flores négatives, mais aussi la qualité organoleptique en libérant des précurseurs d'arômes par les activités protéolytiques (Montel *et al.* 1998; Ammor *et al.* 2005b). Ce couplage permet d'opposer rapidement aux flores négatives des obstacles successifs à leur croissance. Le niveau individuel de ces obstacles combinés pourrait être inférieur à celui qu'il faudrait si on les appliquait individuellement. La notion de pré stabilisation est importante car le couplage proposé ici ne conduit à une viande suffisamment déshydratée, salée, acide pour assurer une longue conservation à l'abri d'altérations microbiennes pour se faire il convient d'ajouter un dernier procédé comme le séchage, l'emballage sous vide, etc...

Les travaux présentés ici font suite à des travaux de recherche qui ont déjà permis de confirmer la faisabilité du couplage. Ils visent à approfondir la connaissance des propriétés de deux souches de *Lb sakei* commerciales utilisées pour inoculer la viande après DII. Les souches de *Lb sakei* ont été isolées à partir des ferments commerciaux, puis leur profil d'assimilation de glucides et leur potentiel enzymatique ont été déterminés. Leurs paramètres cinétiques de croissance ont été mesurés dans un milieu liquide semi-synthétique. Pour finir, les effets des paramètres pH, concentration en NaCl, concentration acide lactique et activité de l'eau, ainsi que de leurs interactions sur la croissance des deux souches ont été étudiés à l'aide d'un réseau uniforme de Doehlert. Le choix des valeurs des facteurs du plan d'expérience est basé sur les caractéristiques physico-chimiques des viandes ayant subi un traitement de DII

Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les bactéries lactiques

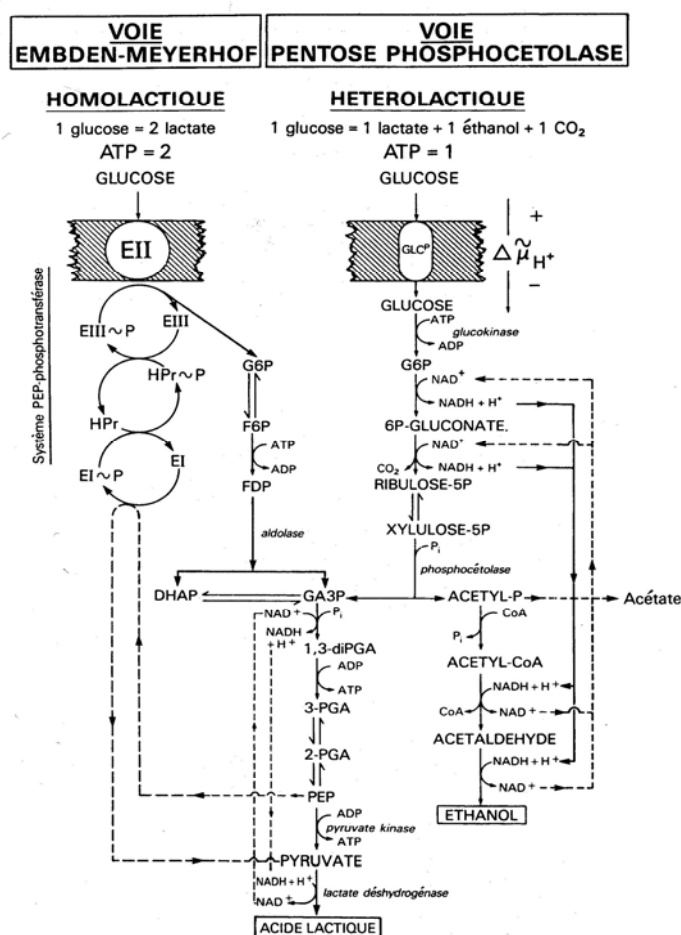
Elles appartiennent à un groupe de bactéries Gram positive, immobiles qui fermentent les hexoses en acide lactique. Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fabrication de nombreux aliments et jouent un rôle économique important. Les techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence une forte diversité génomique qui a conduit à la classification récente en 11 genres bactériens: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*.

Ces bactéries sont mésophiles avec une croissance de 10 °C à 40 °C et l'optimum entre 25 et 35 °C, mais certaines sont capables de se développer à 5 °C ou 45 °C. Elles supportent des pH de 4 à 8 (exceptionnellement de pH 3.2 ou pH 9.6). Ces bactéries exigeantes ne possèdent pas de cycle de Krebs, ni de cytochromes et leur croissance requiert des acides aminés, des bases azotées et des vitamines. Les bactéries lactiques sont des microorganismes hétérotrophes qui tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Elles peuvent métaboliser les hexoses et les pentoses (le ribose et l'arabinose) mais aussi les polyols, les acides organiques et les acides aminés.

1.1. Métabolisme énergétique des bactéries lactiques

La voie EMP produit 2 moles d'ATP et 2 moles d'acide lactique par mole de glucose métabolisé (Figure 1).

Figure 1: Schéma de la fermentation homolactique et hétérolactique (Roissart and Luquet 1994)



Les bactéries lactiques peuvent être classées en deux groupes distincts selon les produits finaux de la fermentation. Celles qui produisent uniquement de l'acide lactique sont dites homofermentaires et celles qui produisent des quantités égales d'acide lactique, d'éthanol et de CO₂ sont dites hétérofermentaires. La voie homofermentaire (figure 1), appelée aussi fermentation homolactique permet de cataboliser une molécule de glucose pour produire 2 molécules de pyruvates, par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnass. Les molécules de pyruvates sont ensuite réduites en lactate par la Lactate déshydrogénase (LDH) en présence de NADH, H⁺. La fermentation hétérolactique catabolise une molécule de glucose pour produire une molécule de lactate, une molécule de CO₂, une molécule d'éthanol et une molécule d'acétate. Le rendement énergétique est différent selon les deux voies à savoir deux moles d'ATP par mole de glucose par la voie homofermentaire et une seule par la voie hétérofermentaire.

1.2. Autres voies métaboliques

Certaines bactéries lactiques peuvent métaboliser quelques polyalcools à 6 et 5 atomes de carbone, pour les utiliser comme source de carbone et d'énergie. C'est le cas par exemple du mannitol, métabolisé par *Lb plantarum* et du sorbitol, métabolisé par *Lb plantarum* et *Lb casei*, qui donnent comme produits finaux deux molécules de pyruvates, transformées ensuite en lactates. *Lb casei* peut aussi dans certains cas, métaboliser des pentitols comme le ribitol et le xylitol. Ces métabolismes conduisent à la formation de lactate, d'éthanol ou d'acétate, de CO₂, de l'eau et de l'énergie sous forme d'ATP (Liu 2003).

Les bactéries lactiques peuvent métaboliser quelques acides organiques comme le malate, le citrate, le tartrate, et les convertir en lactate et autres produits issus du catabolisme du pyruvate. Certaines bactéries lactiques comme *Lb plantarum* (Divies *et al.* 1994; Liu 2003), *Lb casei* et *Lb sakei* peuvent utiliser l'acide lactique comme source d'énergie pour leur croissance en le catabolisant en pyruvate. Le pyruvate ainsi formé est par la suite catabolisé en acétate et en CO₂.

Les acides aminés sont également utilisés par les bactéries lactiques comme substrat pour la formation de lactate et de pyruvate. Comme par exemple, *Lc. lactis* peut métaboliser la serine. Un autre exemple est la formation de directement ou indirectement à partir de l'alanine, et de l'aspartate (Liu 2003).

1.3. Formation des isomères du lactate

La production de L-lactate, de D-lactate, et du mélange des deux stéréo-isomères DL-is est catalysée par des lactates déshydrogénases (LDH) et des lactates racémases. (Hino and S.Kuroda 1993; Liu 2003; Goffin *et al.* 2005). Il existe deux formes de LDH, chacune étant stéréospécifique : la L(+)-LDH qui oriente la transformation du pyruvate en L(+)-lactate et la D(-)-LDH qui oriente la transformation du pyruvate en D(-)-lactate.

La nature des isomères de l'acide lactique synthétisés dépend également des paramètres physicochimiques de la fermentation à savoir : la température ; le pH ; la présence de NaCl et la présence d'acétate de sodium dans le milieu de culture (Lino 2001; Lino *et al.* 2003a; Lino *et al.* 2003b). Le ratio des stéréo-isomères de l'acide lactique formé constitue une

caractéristique propre à une espèce bactérienne qui permet de l'identifier par rapport à d'autres. La nature de l'isomérisation de l'acide lactique formé est importante du point de vue nutritionnel car seule la forme L est utilisée par l'organisme humain, la forme D étant excrétée dans le rein sous forme de lactate. Pour compenser cette excrétion d'anion et maintenir la neutralité ionique de l'urine, le D Lactate est excrété le plus souvent accompagné d'ions calcium ce qui peut entraîner une diminution importante de la calcémie. Pour ces raisons l'OMS préconise de limiter la consommation de produits lactofermentés riches en D lactate aux jeunes enfants et aux femmes enceintes ou ménopausées.

1.4. Facteurs agissant sur la croissance et le métabolisme des bactéries lactiques

1.4.1. Influence des substrats carbonés et énergétiques

L'identité du substrat carboné agit sur la voie de fermentation adoptée par la bactérie lactique et l'isomérisation des lactates formés. Ainsi il a été décrit la possibilité pour une souche de *Lc lactis* d'être homofermentaire sur du glucose et hétérofermentaire sur du maltose (Liu 2003). Lino *et al.* (Lino 2001) ont montré qu'une souche de *Lb sakei* produisait trois fois plus de L-lactate en catabolisant L-Arabinose, D-Ribose et 1,4 fois plus en fermentant D-Trehalose. Alors qu'elle produit en quantités semblables les formes L(+) et D(-) lactate sur D-fructose, D-glucose, maltose, D-mannose, mélibiose et saccharose.

Les concentrations élevées en substrat carbonés permettent d'accroître la vitesse de croissance des bactéries lactiques, mais cela jusqu'à un seuil maximal au delà duquel la vitesse reste constante et devient indépendante de la concentration, comme le décrit la relation de Mickaelis-Menten (Desmazeau and Roissart 1994). Si la présence du substrat en excès n'agit que sur la vitesse de croissance, l'insuffisance peut apporter des modifications sur le métabolisme des bactéries lactiques. Par exemple, *Lc Lactis* est homofermentaire en présence de glucose en concentration suffisante, mais devient hétérofermentaire en condition de glucose limitante (Thomas *et al.* 1979). La limitation de la concentration de glucose influence également l'activités L(+)-LDH et L(-)-LDH et peut orienter l'isomérisation du lactate formé (Yoo *et al.* 1997).

1.4.2. Température

Les bactéries lactiques ont une température optimale de croissance comprise entre 20 et 25 °C, mais certaines peuvent croître à 0 °C (Mataragasa *et al.* 2003; Chaillou *et al.* 2005). Les rendements en biomasse et en acide lactique sont à leurs niveaux maximum lorsque les fermentations sont réalisées aux températures optimales de croissance. La température peut aussi influencer l'isomérisation de l'acide lactique formé. En effet, chez *Lb sakei*, l'activité L(+)-LDH est importante à 25, 30, 35°C alors que l'activité D(-)-LDH l'est moins à 30°C mais nulle à 35°C. De ce fait, aux températures comprises entre 30 et 35°C, il y a une plus grande production de L(+)-lactate (Lino *et al.* 2003a).

1.4.3. pH

La majorité des bactéries lactiques se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (6,5 à 7,5), mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH. La croissance bactérienne est inhibée lorsque le pH du milieu devient acide (Torrino *et al.* 2001; Liu 2003). Le pH influence sur la croissance des bactéries lactiques mais il peut aussi agir sur la voie de fermentation des sucres (homo ou hétérofermentaire), le rendement de la fermentation, et l'isomérisation de l'acide lactique formé. On peut ainsi citer *Lb. Bulgaricus* qui est homofermentaire en milieu acide et hétérofermentaire en milieu alcalin (Rhee and Pack 1980). *L. oenos* qui produit plus de lactate en condition acide qu'en condition alcaline (Champagne *et al.* 1989). *Lb. Manihotivorans* qui produit d'avantage de lactate lors de la fermentation, lorsque le pH est maintenu à 6,0 (Guyot *et al.* 2000). L'utilisation des substrats carbonés peut dévier quand la valeur du pH est voisine de 6 pour la production d'exopolysaccharides. (Berg *et al.* 1995).

1.4.4. Oxygène

Les bactéries lactiques ont une meilleure croissance en anaérobiose mais elles peuvent être aérotolérantes. Certaines souches de *Lb sakei* par exemple peuvent croître en présence de 20 % d'oxygène, à 8 °C, mais ont des taux de croissance supérieurs en anaérobiose et en présence de faible quantité de dioxyde de carbone (10 % de CO₂, 90 % de N₂) (Amanatidou *et al.* 2001). De même, la croissance d'*Oenococcus oeni*, bactérie hétérofermentaire, peut être retardée en aérobiose (Maicas *et al.* 2002).

La présence d'oxygène peut agir sur le métabolisme des glucides. Ainsi en aérobiose, les leuconostocs (hétérofermentaires) produisent plus d'acétate et moins d'éthanol, la production de lactate n'étant pas affectée. Les bactéries lactiques homofermentaires en anaérobiose, produisent moins de lactate, plus d'acétate, et moins d'éthanol et de formate en présence d'oxygène. Cela peut être expliqué par l'augmentation de l'activité pyruvate oxydase, ou l'extrême sensibilité de la pyruvate-formate lyase à l'oxygène (Condon 1987). Le lactate peut également être catabolisé en acétate et CO₂ en aérobiose.

1.4.5. Activité de l'eau

L'eau représente jusqu'à 90 % du poids cellulaire et joue un rôle fondamental en solubilisant les nutriments, en assurant leur transport et en assurant les réactions d'hydrolyse. L'activité de l'eau d'un produit alimentaire indique l'eau disponible pour la croissance des bactéries et le métabolisme du substrat. La réduction de l'activité de l'eau peut agir en abaissant la croissance et en modifiant le métabolisme des bactéries lactiques. En effet, la croissance bactérienne ne s'observe que pour des valeurs de l'activité de l'eau entre 0,90 et 1 (Blickstad 1984). *Lb plantarum* n'est plus capable de se multiplier à une *A_w* de 0,91 (Catté *et al.* 1999). D'après Liu *et al.* (Liu *et al.* 1998), dans les conditions spécifiques de pH testées, la baisse de l'activité de l'eau réduit la multiplication cellulaire de *Lc. lactis* et la production de lactate, mais détourne le métabolisme vers la production d'exopolysaccharide.

Cependant, certaines souches de bactéries lactiques peuvent être insensibles à la variation de l'*A_w* jusqu'à une certaine valeur minimale, comme observé par Blickstad (Blickstad 1984) lors de la fermentation de la viande par *Lactobacillus spp.*

1.4.6. Autres facteurs

D'autres facteurs peuvent agir sur la croissance et le métabolisme des bactéries lactiques. La concentration en NaCl agit en abaissant le taux de croissance des bactéries ou encore en orientant l'isomérisation du lactate formé et la voie de fermentation (Blickstad 1984; Bobllo and Marshall 1992; Cotte *et al.* 1999). Des auteurs (Ammor *et al.* 2005a) ont observé que la présence de NaCl dans le milieu de culture peut élargir la plage de température de croissance *Lb sakei*.

L'acétate de sodium a également une influence prouvée sur le métabolisme de certaines espèces de bactéries lactiques telles que *Lb curvatus*, *Lb paracasei*, *Lb plantarum* et *Lb sakei* (Lino 2001; Lino *et al.* 2002; Lino *et al.* 2003a). Dans les conditions spécifiques de l'expérimentation, il a été montré que la quantité de L(+)-LDH augmente de 30 % en présence d'acétate de sodium à 50 mM et la production de D(-)-LDH est diminuée. Cela favorise la production de L-lactate. Une meilleure croissance bactérienne, donnant une plus grande biomasse finale a aussi été observée.

2. *Lactobacillus sakei*

Lactobacillus sakei est un bacille naturellement présent sur la viande fraîche. Il se développe spontanément lors de la fabrication de saucisson sec non ensemencé, et il devient aussi la flore dominante lors de la conservation de la viande sous vide et à basse température. Il est utilisé industriellement comme ferment lactique pour la fabrication de certains produits de charcuterie (Zagorec *et al.* 2006).

Dans la taxonomie, *Lb. sakei* appartient à la lignée des *FIRMICUTES*, à la classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Lactobacillales*, à la famille des *Lactobacillaceae*, au genre *Lactobacillus* et à l'espèce *sakei* (Garrity and Holt 2001). Les sous espèces de *Lb. sakei* possèdent une hétérogénéité phénotypique mais elles présentent une grande homologie du point de vue génomique (Champomier-Verges 2002). Ce sont des bacilles psychotrophiques, anaérobies facultatifs, Gram positif, et sont regroupés par paire ou en chaîne courte, comme montré dans la figure 2.

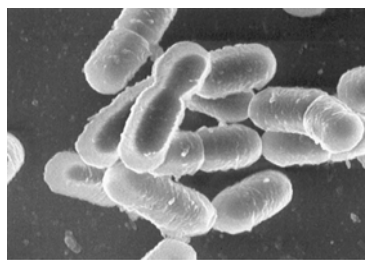


Figure 2: Vue en microscopie à balayage de *Lb sakei* 23K (Champomier *et al.* 1987)

Les souches de *Lb. sakei* sont hétérofermentaires facultatives. Elles fermentent les hexoses, mais également les pentoses par induction de la phosphocétolase, avec production d'acide lactique et acétique (Champomier *et al.* 1987). Les souches de *Lb sakei* peuvent produire des bactériocines qui inhibent le développement de bactéries d'altérations ou pathogènes (Aasen *et al.* 2000; Santo *et al.* 2003). Les bactériocines de *Lb sakei* portent le nom de sakacin. Plusieurs sont décrites dans la littérature. La sakacin A a été la première isolée et caractérisée par Holck *et al.* en 1992. (Holck *et al.* 1992). Cette bactériocine de 41

acides aminés et de 4300 Da est active contre *Listeria monocytogenes*. Depuis, une dizaine d'autres molécules ont été isolées et étudiées. Certaines souches de *Lb. sakei* possèdent une activité catalase en présence d'hème, ce qui permet de contribuer à la détoxification du produit fermenté, en éliminant le peroxyde d'hydrogène, et de réduire ou de ralentir le rancissement des lipides des produits carnés (Knauf *et al.* 1992; Chaillou *et al.* 2005). Ces caractères confèrent aux souches de *Lb. sakei* un potentiel technologique de bioconservation de produits alimentaires.

3. Caractérisation des souches de *Lactobacillus sakei*

3.1. Critères de caractérisation des bactéries lactiques

La différenciation et l'identification des bactéries lactiques sont souvent réalisées par la caractérisation génotypique faisant appel aux techniques moléculaires et à la caractérisation phénotypique basée sur les caractéristiques morphologiques, culturelles et biochimiques. Pour notre part, nous nous limiterons à la caractérisation phénotypique des souches étudiées. La caractérisation génotypique a été réalisée en parallèle à notre étude, par une autre étudiante.

Les critères fréquemment utilisés par divers auteurs pour caractériser les bactéries lactiques dont *Lactobacillus sakei* sont: la morphologie cellulaire, les voies de fermentations, les produits issus de la fermentation de différents substrats, l'isomérisation des lactates formés, la croissance en fonction des paramètres du milieu environnant (pH, température, activité de l'eau, NaCl, les activités enzymatiques, et les propriétés inhibitrices de pathogènes. (Rovira *et al.* 1997; Lino *et al.* 2003b; Papamanoli *et al.* 2003; Ammor and Mayo 2007).

Partie 2 : MATERIELS ET METHODES

1. Isolement des souches de *Lb. sakei*

Les ferments lactiques commerciaux utilisés pour cette étude sont commercialisés par la société TEXEL (Dange-Saint-Romain, France) et la société Soussana (Thiais, France) pour Tradi 313. Ce sont des bactéries sèches actives qu'il faut réhydrater avant utilisation. Le ferment TEXEL est constitué de souches de *Lb sakei* à 99 % et celui de la société Texel à 99,99 %.

Quelques grammes de chaque ferment sont réhydratés dans de l'eau distillée stérile pendant 15 minutes. A partir de chacune des suspensions, des isolements sont réalisés par la méthode des cadrans à l'oese de platine sur milieu MRS Agar (Biokar Diagnostics, France) incubé à 30°C pendant 48 h. Les colonies obtenues sont sous clonées pour vérifier leur pureté sur le milieu MRS dans des boîtes de Pétri. Elles sont identifiées par les différents tests cités ci-dessous. Les souches pures sont conservées sur milieu MRS Agar incliné à 4 °C.

2. Identification des souches de *Lb. sakei*

2.1. La coloration de Gram

Des frottis séchés fixés à l'éthanol sont colorés en utilisant le Kit coloration de Gram-hücker (RAL réactifs, Martillac, France). L'observation est réalisée au grossissement 1000 en immersion.

2.2. Le test catalase

Le test catalase est réalisé avec un réactif colorant (ID Color Catalase, BioMérieux, France), en suivant les instructions du fournisseur.

2.3. Le test oxydase

Ce test est réalisé avec une bandelette à zone réactionnelle (Microbiologie Bactident Oxydase de la société Merck, Allemagne). Une colonie bien isolée est placée sur la zone réactionnelle de la bandelette une pipette Pasteur fermée stérile. Un résultat positif se traduit par une coloration bleue qui apparaît après 20 à 60 secondes.

2.4. La galerie API 50 CH

La galerie Api 50 CH (BioMérieux, France) est utilisée pour déterminer le profil de fermentation de souches de bactéries lactiques (McLeod et al. 2008). Cette galerie combinée est constituée de 50 microtubes qui contiennent différents substrats carbonés et un indicateur de pH, le bromocrésol pourpre. Les microtubes sont présentés en deux parties, un tube et une cupule. Les tubes sont remplis avec le milieu API 50 CHL Medium de BioMérieux (France) inoculé par la souche à tester. La cupule est remplie d'huile de paraffine stérile. L'incubation

à 30 °C dure 24 h à 48 h. Un test positif se traduit par le virage au jaune de la couleur du tube qui témoigne de l'acidification du milieu après 24 et/ou 48 h d'incubation.

2.5. La galerie enzymatique API ZYM

La galerie API ZYM commercialisée par BioMérieux (France) est utilisée pour caractériser le potentiel enzymatique de souches bactériennes (Papamanoli et al. 2003). La galerie est constituée de 20 tests en cupule. Les cupules sont inoculées avec une suspension dense de la souche à analyser dans le milieu API Suspension Medium de BioMérieux, France. La galerie est incubée à 37 °C pendant 4 h. Une goutte de réactif ZYM A puis une goutte de réactif ZYM B (BioMérieux, France) sont ensuite ajoutées dans les cupules. La galerie est exposée au soleil 5 minutes. Les réactions sont positives lorsqu'il y a un changement de couleur par rapport au témoin non inoculé.

3. Etude de la croissance et du métabolisme de *Lb sakei* (Texel et Tradi)

3.1. Etude de la croissance

3.1.1. Le milieu de croissance

Le suivi de la croissance des souches de *Lb sakei* est réalisé sur le milieu SYAM, formulé par Calderon *et al.* (Calderon *et al.* 2001). La composition de ce milieu est de 20 g/l d'Extrait de levure (Difco – France), de 5 g/l d'Acétate de sodium anhydre (Panreac, Espagne), de 0,207 g/l de Sulfate de magnésium heptahydraté (Fluka Chemica, Suisse), de 0,056 g/l de Sulfate de manganèse monohydraté (Fluka Chemica, Suisse), de 6,38g/l de Potassium dihydrogenophosphate anhydre (Prolabo – France), de 3,52 g/l de Sodium phosphate dibasique bihydraté (Merck, Allemagne), et de 20 g/l de glucose (Panreac, Espagne). Le glucose est ajouté sous forme de solution concentrée à 400 g/l stérilisée séparément pour éviter la réaction de Maillard. Le pH du milieu est de 6,05 après stérilisation.

3.1.2. Les cinétiques de croissance

Les cinétiques de croissance sont réalisées dans des tubes contenant 10 ml de milieu de culture inoculé à raison de 28 ml de préculture (10 heures à 30°C) additionnés à 272 ml de milieu SYAM stérile. Après une bonne homogénéisation, le mélange est ensuite versé dans 26 tubes à raison de 10 ml par tube. Chaque tube est utilisé au fur et à mesure pour les analyses. Le suivi de la croissance est réalisé par turbidimétrie dans des cuves de 1 cm de trajet optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. La population microbienne est dénombrée sur milieu MRS agar incubé à 30 °C pendant 48h. Chaque dilution décimale est ensemencée sur trois boîtes de Pétri. Le résultat est exprimé en UFC/ml.

3.1.3. Mesure du pH et de l'acidité titrable

Le pH et l'acidité titrable sont mesurés à l'aide d'un titrimètre automatique (Titroline easy de marque Schott, Allemagne). L'acidité titrable est mesurée en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium titrée à 0,1 N jusqu'à l'obtention de pH = 8,3. L'acidité titrable exprimée en gramme d'acide lactique est donc calculée à partir de la relation :

$$[AL] = \frac{T_B \times V_B}{V_A} \times 90$$

Avec [AL] = concentration en acide lactique en gramme par litre

T_B = Concentration de NaOH (0,1 N)

V_B = Volume de NaOH 0.1 N en ml

V_A = Volume de milieu de culture en ml

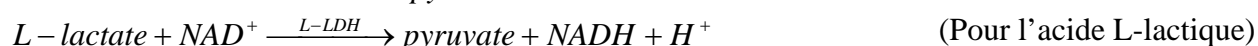
90 = masse molaire de l'acide lactique

3.2. Etude du métabolisme de *Lb sakei*

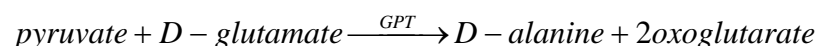
3.2.1. Dosage de l'acide lactique

Le dosage de l'acide lactique est réalisé avec le kit ENZYTEC™ fluid 5240D (SCIL Diagnostics, Allemagne) pour l'acide D-lactique et le kit ENZYTEC™ 5260L (SCIL Diagnostics) pour l'acide L-lactique, selon le protocole préconisé par le fournisseur.

Le dosage de l'acide lactique se fait par spectrophotométrie à 340 nm en dosant le NADH produit selon les réactions :

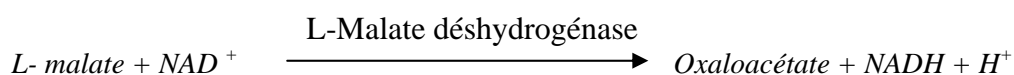
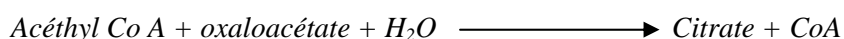
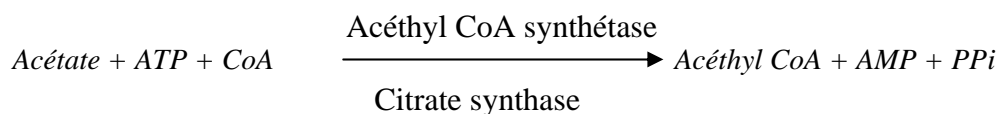


Ces réactions sont réversibles, et le pyruvate est éliminé ensuite par une réaction :



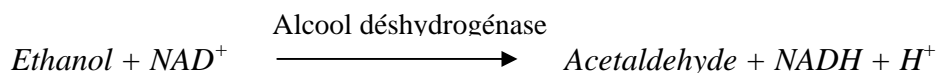
3.2.2. Dosage de l'acide acétique

Le dosage de l'acide acétique se fait avec le kit ENZYTEC™ n° 1226 (SCIL Diagnostics, Allemagne), en dosant par spectrophotométrie à 340 nm le NADH produit selon les réactions :



3.2.3. Dosage de l'éthanol

Le dosage de l'éthanol est réalisé avec un kit enzymatique R-Biopharm, France) en dosant par spectrophotométrie à 340 nm le NADPH produit selon la réaction :



3.2.4. Dosage des glucides G1 à G7

Le dosage des sucres (glucose, maltose, maltotriose, maltotétraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose) a été effectué au laboratoire de la DGCCRF de l'île de la Réunion (Direction Générale de la Consommation, de la Concurrence et de la Répression des Fraudes), par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) ionique.

La chaîne de chromatographie utilisée est un système Dionex DX500 : pompe haute pression à gradient quaternaire, détecteur ampérométrique PAD ED40 avec électrode en or, logiciel d'intégration PEAKNET version 4.10 sous les conditions opératoires suivantes :

- Colonne Dionex Carbopac PA1 (250 x 4 mm) et colonne de garde d'échangeuse d'anions
- Détecteur : 3 potentiels imposés:
 - 0,40s E1=0,05V
 - 1,20s E2 = 0,75V
 - 0,40s E3 = -0,15V
- Eluant :
 - Eluant A NaOH 0,1 N et acétate de sodium 0,003 N
 - Eluant B NaOH 0,1 N et acétate de sodium 1N
 - Eluant C: eau ultra pure
 - Eluant D NaOH 2N
- Un gradient d'élution:
 - t=0: A 100%; B 0%
 - t=30 min: A 50%; B 50%
- Un débit d'élution constant de 1,0 ml.min⁻¹
- Injecteur de 25µl

Les étalons sont constitués de solutions à 50 mg/l du sucre correspondant au sucre dosé [Glucose (G1), Maltose (G2), Maltotriose (G3), Maltotétraose (G4), Maltopentaose (G5), Maltohexaose (G6), Maltoheptaose (G7)]. Les échantillons sont dilués au moins aux 1/5^{ème}, puis filtré avec des filtres seringues Minisart Sartorius hydrophyles de 0,22 µm avant l'injection. La concentration en sucre est obtenue à partir de la relation :

$$C = \frac{\text{Aire}_{\text{échantillon}} \times C_{\text{étalon}}}{\text{Aire}_{\text{étalon}}} \times fd \quad \text{mg.l}^{-1}$$

Avec

C = concentration en sucre de l'échantillon

C étalon = concentration en sucre de l'étalon (mg.l⁻¹)

fd = facteur de dilution

3.2.5. Dosage du lactose

Le dosage du lactose a été réalisé par le laboratoire du CIRAD à la Réunion par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) avec une colonne Hi-Plex Calcium (Ca) (colonne + pré colonne). Les conditions opératoires utilisées sont les suivantes :

- Détecteur : ELS
- Eluant : Eau Ultra pure
- Débit d'élution constant : 0,6 ml.min⁻¹
- Volume d'injection : 20µl
- Température du four : 80°C
- Programme : Mangue/Ananas
- Méthode : Lactose quadratique
- Temps de rétention : 9,617 minutes
- Temps d'analyse : 30 minutes

Les étalons sont constitués de solutions de lactose de différentes concentrations (100, 50, 25 et 12.5 mg/l). L'échantillon est filtré avec des filtres seringues Minisart Sartorius hydrophyles de 0,22 µm avant l'injection. La concentration en lactose est obtenue à partir de la relation :

$$C_{\text{lactose}} = \frac{\text{Aire}_{\text{échantillon}} \times C_{\text{étalon}}}{\text{Aire}_{\text{étalon}}} \times fd \quad (\text{en mg.l}^{-1})$$

Avec

C_{lactose} = concentration en sucre de l'échantillon

C étalon = concentration en sucre de l'étalon (mg.l⁻¹)

fd = facteur de dilution

4. Etude des effets du pH, de la concentration en NaCl, de la concentration en acide lactique et de l'activité de l'eau sur la croissance de *Lb sakei*

4.1. Principe du réseau uniforme de Doelhart

Les facteurs pris en compte sont le pH, la concentration en NaCl, la concentration en acide lactique et l'activité de l'eau. La réponse considérée est le taux de croissance de *Lb sakei* au cours de phase exponentielle de croissance. Le nombre d'essai est de 21 selon que $N \geq k^2 + k + 1$ où N est le nombre d'essai et k le nombre de facteurs (k = 4 dans notre cas). L'essai aux points centraux est répété 3 fois afin d'estimer la variance résiduelle. La réponse est décrite par le modèle quadratique à 15 coefficients :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_{11}X_1^2 + a_2X_2 + a_{22}X_2^2 + a_3X_3 + a_{33}X_3^2 + a_4X_4 + a_{44}X_4^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{14}X_1X_4 + a_{23}X_2X_3 + a_{24}X_2X_4 + a_{34}X_3X_4$$

Avec $X_1 = \text{pH}$; $X_2 = [\text{NaCl}]$; $X_3 = [\text{Acide Lactique}]$; $X_4 = A_w$

4.2. Domaine expérimental

Le tableau suivant montre les niveaux de facteurs correspondant aux valeurs codées du plan d'expérience.

Tableau 1: Domaine expérimental et niveau de distribution des variables pour la détermination des effets du pH, de [NaCl], de [AL] et de l' A_w sur le taux de croissance de *Lb sakei*

Facteurs	Niveaux	Valeurs expérimentales
X1 : pH	5	4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6
X2 : Concentration NaCl (% p/v)	7	0,536 ; 1,692 ; 2,844 ; 4,000 ; 5,155 ; 6,308 ; 7,464
X3 : Concentration en AL (g/l)	7	5,520 ; 11,628 ; 23,877 ; 30,000 ; 36,123 ; 48,372 ; 54,480
X4 : Activité de l'eau	1	0,909 ; 0,945 ; 0,981

4.3. Préparation des milieux de culture

Le NaCl (Prolabo, France) et l'acide L-lactique (Panreac, Espagne) sont ajoutés au milieu SYAM sans glucose selon les concentrations prévues. Le pH est ensuite ajusté avec une solution de NaOH 10 N (Prolabo, France). L' A_w est ajustée à la fin, avec du glycérol (Panreac, Espagne). Le glucose du milieu SYAM est ajouté séparément en solution concentrée stérile. Les milieux sont inoculés avec une préculture de 12 h à 30°C.

4.4. Suivi de la croissance

Le suivi de la croissance de *Lb sakei* est réalisé par turbidimétrie à 600 nm avec un lecteur multifonction (Tecan Infinite 200) dans des microplaques stériles de 96 puits. Les mesures sont réalisées pendant 5 h, à des intervalles de temps de 1h. Chaque mesure est effectuée après une agitation de 30 s d'une amplitude de 2 mm pour homogénéiser la suspension microbienne.

4.5. Analyse des données

A partir des résultats expérimentaux, les coefficients du modèle quadratique Y sont calculés par régression linéaire multiple, à l'aide du logiciel Statistica7.

Partie 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Identification des souches isolées des ferments Texel et Tradi

1.1. La coloration de Gram

Les colorations de Gram réalisées sur les souches isolées à partir des ferments Texel et Tradi 313 sont présentées dans la figure 3. Il est possible d'observer des bacilles coloration de Gram positive, allongés, regroupés par pair ou en chaînes courtes.

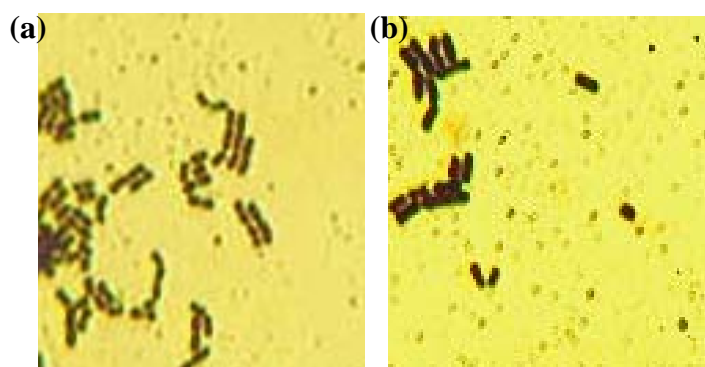


Figure 3: Photos des colorations de Gram réalisées sur les souches isolées de (a) Ferment Tradi 313 et (b). Ferment Texel.

1.2. Tests catalase et oxydase

Les tests catalase et oxydase effectuées sur les souches isolées à partir des ferments ont donné les résultats montrés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résultats des tests catalase et oxydase des bacilles isolés des ferments Texel et Tradi 313.

	Test Oxydase	Test Catalase
<i>Lb sakei</i> Texel	(-)	(-)
<i>Lb sakei</i> Tradi	(-)	(-)

Les résultats négatifs pour les deux tests permettent de confirmer l'appartenance au groupe des lactobacilles lactiques. Le test catalase montre l'absence d'enzyme permettant d'éliminer le peroxyde d'hydrogène. Cependant, *Lb. sakei* est connu comme possédant un gène codant un catalase dont l'expression dépend de la présence abondante d'hème (Ammor *et al.* 2005a; Chaillou *et al.* 2005; Zagorec *et al.* 2006) Cette propriété lui permet d'hydrolyser les peroxydes d'hydrogène (H₂O₂) susceptibles d'engendrer une décoloration et une rancidité indésirables des produits carnés fermentés.

1.3. Galerie API 50 CH

Tableau 3: Résultats de la galerie API 50 CH des lactobacilles isolés des ferments Texel et Tradi 313

		Texel Après 24 heures	Tradi	Texel Après 48 heures	Tradi
0	TEMOIN	-	-	-	-
1	Glycerol	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-
4	L-Arabinose	-	+	-	+
5	D-Ribose	-	+	+	+
6	D-Xylose	-	-	-	-
7	L-Xylose	-	-	-	-
8	D-Adonitol	-	-	-	-
9	Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-
10	D-Galactose	+	+	+	+
11	D-Glucose	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+
14	L-Sorbose	-	-	-	-
15	L-Rhamnose	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-
18	D-Mannitol	-	-	-	-
19	D-Sorbitol	-	-	-	-
20	Méthyl-αD-Mannopyranoside	-	-	-	-
21	Méthyl-αD-Glucopyranoside	-	-	-	-
22	N-Acetyl-Glucosamine	+	+	+	+
23	Amygdaline	-	-	-	-
24	Arbutine	-	-	-	-
25	Esculine citrate de fer	+	+	+	+
26	Salicine	-	-	-	-
27	D-Celiobiose	-	-	-	-
28	D-Maltose	-	-	-	-
29	D-lactose	+	-	+	-
30	D-Melibiose	+	-	+	-
31	D-Sacharose	+	-	+	-
32	D-Trehalose	+	+	+	+
33	Inuline	-	-	-	-
34	D-Mélézitose	-	-	-	-
35	D-Raffinose	-	-	-	-
36	Amidon	-	-	-	-
37	Glycogène	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-
39	Gentiobiose	-	-	-	-
40	D-Turanose	-	-	-	-
41	D-Lyxose	-	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	-	-
43	D-Fucose	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-
47	Potassium Gluconate	L*	L	L	L
48	Potassium 2-Cétogluconate	-	-	-	-
49	Potassium 5-Cétogluconate	-	-	-	-

*: légèrement positif

Surligné: les résultats positifs pour les deux souches

D'après les résultats présentés dans le tableau 3, les deux souches peuvent cataboliser le D-Ribose, le D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, le N-Acetyl-Glucosamine, l'esculine citrate de fer, le D-Trehalose, et faiblement le Potassium 2-Cétogluconate. Elles présentent cependant des différences dans leurs capacités à fermenter certains glucides. En effet, la souche isolée du ferment Tradi 313 peut fermenter le L-arabinose, contrairement à celle isolée du ferment Texel. Mais elle ne fermente ni le D-Lactose, ni D-Melibiose et ni le D-Saccharose, alors que la souche du ferment Texel montre des réponses positives pour ces 3 derniers oses.

Les résultats obtenus correspondent sensiblement à nos données bibliographiques. En effet, les souches de *Lb sakei* testées par Dellaglio *et al.* (Dellaglio *et al.* 1994), Lino *et al.* (Lino *et al.* 2003b), Ammor *et al.* (Ammor *et al.* 2005a) et McLeod *et al.* (McLeod *et al.* 2008), sont capables de fermenter le D-Ribose, le D-galactose, le D-glucose, le D-fructose, le D-mannose, la N-Acetyl-Glucosamine, le D-Trehalose, et le Potassium 2-Cétogluconate. Cependant, pour le D-Melibiose et D-Saccharose, les publications sur *Lb sakei* (Dellaglio *et al.* 1994; Lino *et al.* 2003b; Ammor *et al.* 2005a) que nous avons pu consulter, ont montré des réponses positives, contrairement aux résultats montrés dans le tableau 3. Concernant le Lactose, certaines souches de *Lb sakei* sont capables de le cataboliser alors que d'autres ne le sont pas. (Dellaglio *et al.* 1994) (Ammor *et al.* 2005a; McLeod *et al.* 2008).

1.4. Test API ZYM

Les résultats du test API ZYM sont reportés dans le tableau 4. Toutes les souches testées présentent des activités Leucine arylamidase, Valine arylamidase et Cystine arylamidase. L'intensité de la coloration de la réaction est très grande signifiant de fortes activités. Les activités Phosphatase acide et Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase sont également présentes chez toutes les souches testées (Papamanoli *et al.* 2003; Ammor *et al.* 2005a). Ce sont les enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse des esters phosphorylés et les réactions de transfert du phosphate, lors de la glycolyse.

La souche isolée de Tradi 313 ici caractérisée, se distingue de la souche Texel par la présence d'une activité phosphatase alcaline, lipase (C14) et β -galactosidase. Il est à noter que l'intensité des réactions pour les activités phosphatase alcaline et la lipase (C14) est très faible, et elle est moyenne pour l'activité β -galactosidase, si l'on se réfère à l'intensité de la coloration pour les tests Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Phosphatase acide et Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase.

D'après nos données bibliographiques, les activités lipolytiques peuvent être présentes ou non selon les souches de *Lb sakei* testées. Ces activités sont faibles quand elles sont présentes (Montel *et al.* 1998). Papamanoli *et al.* (2003) (Papamanoli *et al.* 2003) ont observé des activités lipolytiques chez 21 souches de *Lb. sakei* sur les 49 souches testées. Ammor *et al.* (Ammor *et al.* 2005a) n'ont retrouvé de lipase (C14) que chez une souche parmi les 36 étudiées. Enfin, d'après Demeyer *et al.* (Demeyer *et al.* 2000), lors de la fermentation des produits carnés, la lipolyse est surtout réalisée par les lipases de la viande, et non par les lipases bactériennes qui ont des activités trop faibles.

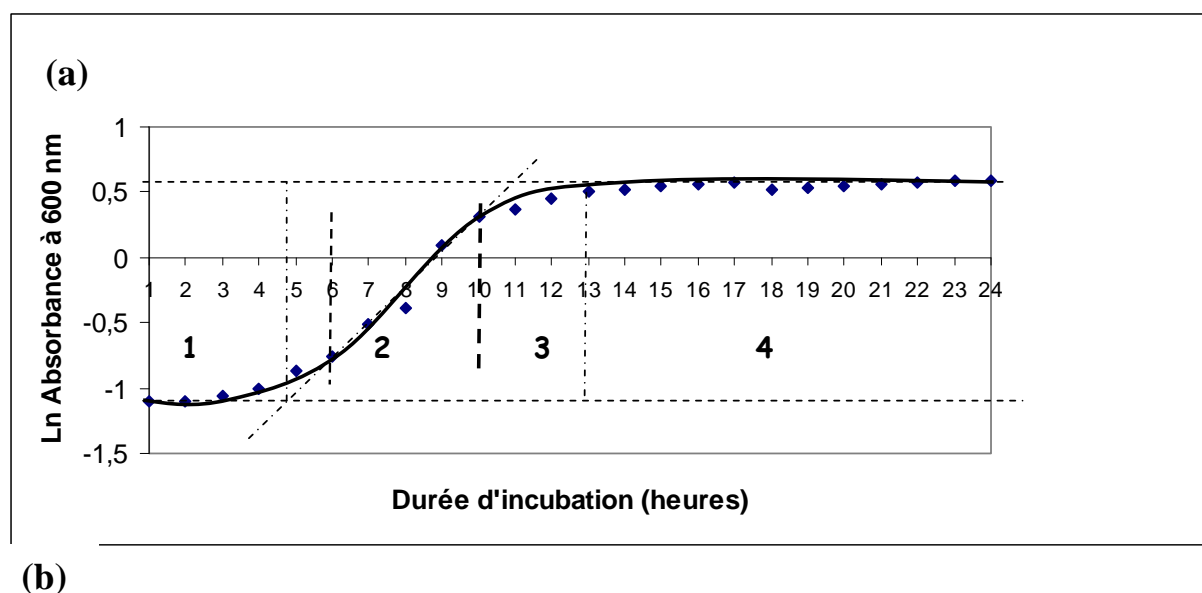
Les souches de *Lb sakei* testées par Papamanoli *et al.* (Papamanoli et al. 2003) présentent 27 % de réponses positives à la phosphatase alcaline et 60 % à la β -galactosidase. Une seule souche de *Lb. sakei* sur les 36 testées par Ammor *et al.* (Ammor et al. 2005a) possède la phosphatase alcaline, 6, sur ces 36 souches présentent une activité de la β -galactosidase.

Tableau 4: Résultats du test APIZYM réalisé sur les souches isolées des ferments Tradi 313 et Texel

N°	Activité recherchée	Texel	Tradi
1	Témoin	-	-
2	Phosphatase alcaline	-	+
3	Estérase (C4)	-	-
4	Estérase lipase (C8)	-	-
5	Lipase (C14)	-	+
6	Leucine arylamidase	+	+
7	Valine arylamidase	+	+
8	Cystine arylamidase	+	+
9	Trypsine	-	-
10	α -chymotrypsine	-	-
11	Phosphatase acide	+	+
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
13	α -galactosidase	-	-
14	β -galactosidase	-	+
15	β -glucuronidase	-	-
16	α -glucosidase	-	-
17	β -glucosidase	-	-
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-
19	α -mannosidase	-	-
20	α -fucosidase	-	-

2. Etude de la croissance et du métabolisme de *Lb sakei* (Texel et Tradi)

2.1. Cinétique de croissance



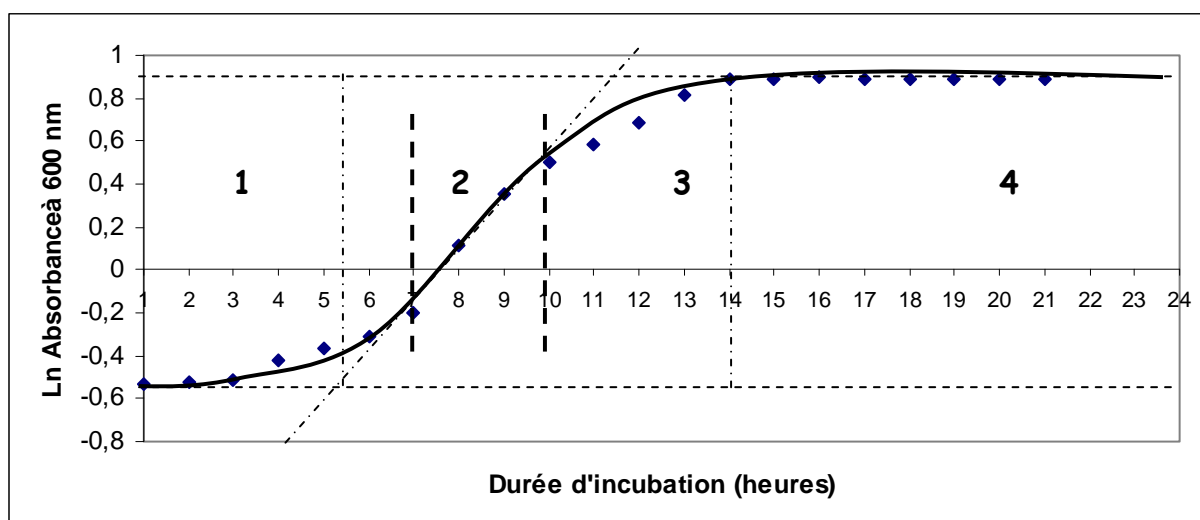


Figure 4: Courbe de croissance sur milieu SYAM non renouvelé à 30°C de la souche isolée du ferment Texel (a) et du ferment Tradi313 (b). Les différentes phases sont indiquées par 1 (latence), 2 (phase exponentielle), 3 phase de ralentissement et 4 (phase stationnaire)

Les courbes de croissance des souches isolées des deux ferments sur milieu SYAM non renouvelé à 30°C sont présentées dans la figure 4a. et 4b. Les différentes phases de la croissance sont identifiées. Concernant la présence et la durée de la phase de latence, on peut faire remarquer que les milieux ont été inoculés sans préculture initiale sur le milieu SYAM mais directement à partir de tubes de collection en milieu MRS agar en pente conservés à 4°C. Dans ces conditions, on peut observer des différences entre les cinétiques des souches ainsi la durée de la phase de latence de la souche Texel est de 4 h 30 mn environ comparée à celle plus longue de la souche isolée de Tradi 313 (5 h 30 mn environ). La durée de la phase de croissance exponentielle est de 4 heures environ pour les deux souches. Enfin, la phase de ralentissement est plus longue pour la souche Tradi 313.

La cinétique de croissance des deux souches de *Lb sakei* dans le syam non renouvelé, inoculé après une préculture sur le milieu SYAM est reporté dans la figure 5.

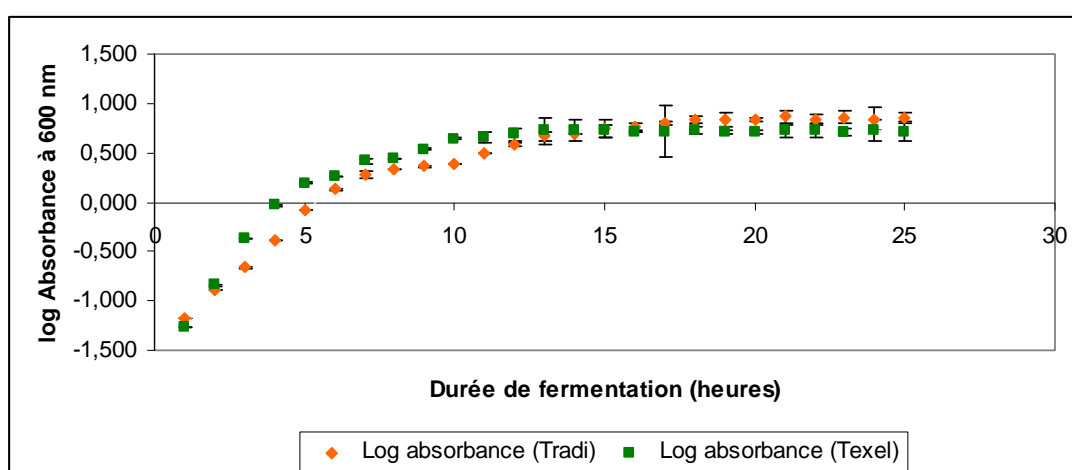


Figure 5: Courbe de croissance sur milieu SYAM non renouvelé à 30 °C de la souche isolée du ferment Tradi313 (a) et du ferment Texel (b) inoculées après préculture sur milieu SYAM.

Dans les deux cas, la croissance des souches démarre directement en phase exponentielle, ce qui était attendu. La souche Texel démarre avec un taux de croissance de 0,9

h^{-1} qui durera 2 heures. Ce taux de croissance commencera à baisser à une valeur de $0,7 \text{ h}^{-1}$ dès la troisième heure de d'incubation. Le temps de génération est de 1,14 h durant la croissance exponentielle pour la souche Texel. La souche Tradi se multiplie avec un taux de croissance de $0,6 \text{ h}^{-1}$ et un temps dégénération de 0,72 h durant la croissance exponentielle qui dure 4 heures. On observe que la population dénombrable sur milieu MRS agar de la souche isolée du ferment Tradi 313 est de $1,6 \cdot 10^9 \text{ UFC /ml}$, beaucoup plus importante que celle dénombrée en fin phase stationnaire pour la souche isolée du ferment Texel qui atteint $1,2 \cdot 10^9 \text{ UFC/ml}$.

L'évolution du pH et de la concentration en acide lactique au cours de la fermentation du milieu SYAM non renouvelé à 30°C par les différentes souches est reportée dans la figure 6.

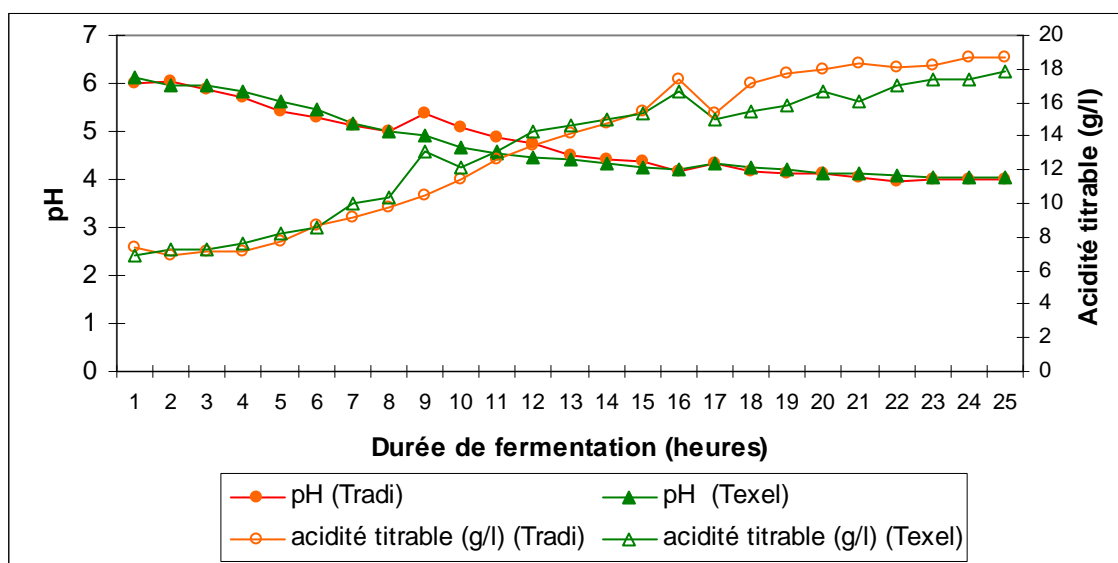


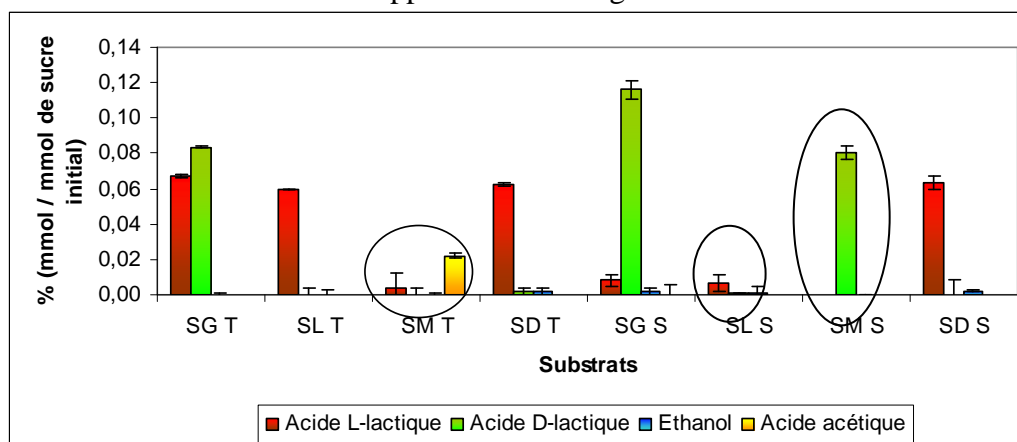
Figure 6: Evolution du pH et de l'acidité titrable lors de la croissance sur milieu SYAM non renouvelé à 30°C des souches isolées des ferments Tradi 313 et Texel inoculées après préculture sur le milieu SYAM.

On n'observe pas de différence significative entre les deux souches en ce qui concerne l'évolution du pH. Les valeurs de pH après 24 H de fermentation sont sensiblement identiques avec cependant une acidification soit respectivement 4,01 pour le milieu inoculé avec la souche isolée de Tradi313 et 4,05 pour le milieu inoculé avec la souche isolée de Texel. La mesure de l'acidité titrable vérifie cette différence et montre que l'acidification du milieu est légèrement plus forte avec la souche isolée du ferment Tradi313 qu'avec celle isolée du ferment Texel, soit 18,74 g/l d'acide lactique pour la souche Tradi et de 17,87 g/l d'acide lactique pour la souche Texel.

Pour les deux souches, on peut observer une évolution constante de l'acidité titrable même pendant la phase stationnaire montrant un découplage entre la multiplication cellulaire et l'acidification. Ainsi la croissance de *Lb sakei* Texel s'arrête au pH 4,3, lorsque la quantité d'acide lactique produite est de 14,9 g/l. La croissance est donc inhibée par la concentration en acide lactique. Pour la souche Tradi 313, la croissance s'arrête au pH 4,03 avec une acidité titrable de 18,3 g/l. La possibilité de découpler la multiplication cellulaire et la synthèse d'acide lactique est une propriété de nombreuses bactéries lactiques.

2.2. Métabolisme de *Lb sakei* tradi et *Lb sakei* Texel dans le syam à 30 °C

L'étude du métabolisme de *Lb sakei* sur différents substrats a été réalisée en dosant l'acide L-lactique, l'acide D- lactique, l'acide acétique, l'éthanol et les sucres à l'issus de 48h de fermentation. Les résultats sont rapportés dans la figure 7.



SG T : Syam Glucose inoculé avec *Lb sakei* Texel
 SL T : Syam Lactose inoculé avec *Lb sakei* Texel
 SM T : Syam Maltose inoculé avec *Lb sakei* Texel
 SD T : Syam DE 21 inoculé avec *Lb sakei* Texel

SG S : Syam Glucose inoculé avec *Lb sakei* Tradi
 SL S : Syam Lactose inoculé avec *Lb sakei* Tradi
 SM S : Syam Maltose inoculé avec *Lb sakei* Tradi
 SD S : Syam DE 21 inoculé avec *Lb sakei* Tradi

Figure 7: Quantité d'acide lactique (D et L), d'éthanol et d'acide acétique produite lors du catabolisme du glucose, du lactose, du maltose et du DE 21 par la souche Tradi et la souche Texel, après 48 h de fermentation

Les résultats obtenus après 3 répétitions montrent que *Lb sakei* Tradi et *Lb sakei* Texel sont homofermentaires sur le glucose, le lactose, le maltose et le DE 21. Il n'y a pas de production d'éthanol ni d'acide acétique au cours de la fermentation. Les quantités d'acides lactiques produites montrent que *Lb sakei* Tradi est presque incapable de cataboliser le lactose et *Lb sakei* Texel le maltose. Cela est en accord avec les résultats du test API 50 CHL. Nous pouvons cependant retrouver de l'acide D-lactique dans le milieu fermenté par la souche Tradi, alors que le test API 50CHL montrait également une réponse négative par la souche Tradi pour ce substrat.

Le tableau 5 donne les isomères D et L de l'acide lactique produit au cours de fermentations réalisées avec chacune des deux souches étudiées dans le milieu SYAM complémenté en glucose, lactose, maltose et DE21.

Tableau 5 : Isomères de l'acide lactique formés par les souches *Lb sakei* Texel et *Lb sakei* Tradi lors de la fermentation de glucose, lactose, maltose et DE21.

	<i>Lb sakei</i> Texel	<i>Lb sakei</i> Tradi
Glucose	DL	D
Lactose	L	L / pas de fermentation
Maltose	L/ pas de fermentation	D
DE 21	L	L

La souche Texel produit les deux isomères de l'acide lactique en quantité équilibrée en catabolisant le glucose (45 % d'acide L-lactique et 55 % d'acide D par rapport à la quantité totale d'acide lactique formée). Elle produit la forme L à plus de 95 % en catabolisant le lactose, le maltose et le DE 21.

Lb sakei Tradi produit de l'acide D-lactique à 90 % en fermentant le glucose, les forme D et L en quantité équilibrées avec le maltose et la forme L sur le DE 21.

Le dosage des sucres restants après 48 h de fermentation des différents milieux a donné les résultats illustrés dans la figure 8.

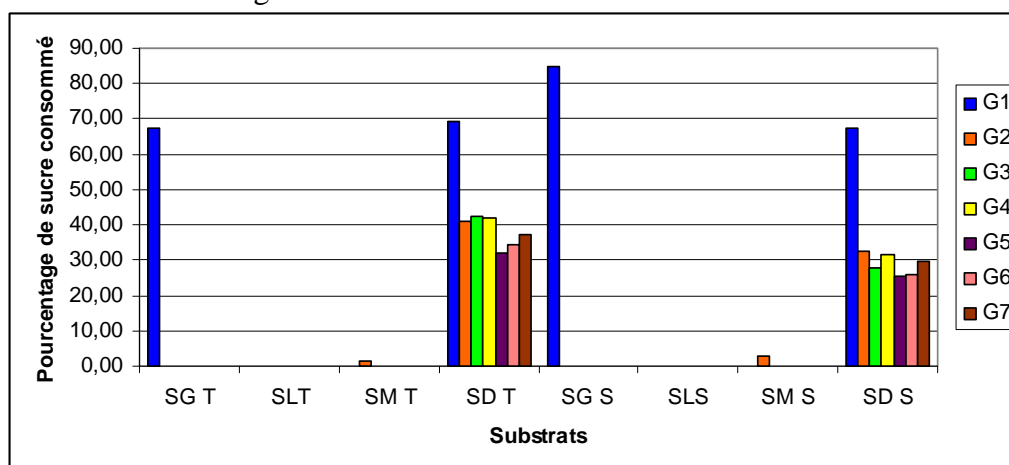


Figure 8: Pourcentage de sucre consommé après 48h de fermentation par *Lb sakei* sur différents substrats

Les résultats pour le lactose ne sont pas donnés dans cette figure. Nous pouvons observer que la souche Tradi 313 consomme plus de glucose que la souche Texel. Les deux souches ne fermentent que très faiblement le maltose. Pour le DE 21, les deux souches catabolisent à peu près la même quantité de G1, et sont toutes les deux capables de fermenter une partie des sucres de G2 à G7.

3. Effet du pH, de la concentration en NaCl, de la concentration en acide lactique et de l'activité de l'eau sur la croissance de *Lb sakei*

L'objectif de cette expérimentation étant d'avoir une prévision du comportement de la souche de *Lb sakei* sur une viande ayant subi un traitement de Déshydratation par imprégnation immersion (DII), les valeurs des facteurs ont donc été choisies en considérant les caractéristiques physico-chimiques de la viande après DII et au cours de la fermentation après DII.

Ainsi, le pH a été pris entre 4 et 6 parce que le pH de la viande après DII peut atteindre 5,8 selon les conditions de DII appliquées, et lors de la fermentation il peut descendre jusqu'à 4 en surface par accumulation d'acide acétique et d'acide lactique. La concentration en NaCl a été choisie entre 0 et 8 % (p/v) par rapport au milieu de culture car la concentration en sel de la viande après DII est aux environs de 4 % mais pourrait atteindre 8 % à proximité de la surface, selon la diffusion du sel à l'intérieure de la viande. L'étude de l'effet de l'acide lactique a été effectuée entre les valeurs de 0 à 60 g/l de milieu de culture car la teneur en acide L-lactique retrouvée sur la viande fraîche se situe dans cet intervalle. Enfin, l'*Aw* a été

prise entre 0,90 et 0,99 car l' A_w de la viande fraîche est de 0,99, et le seuil limite inférieur de croissance de *Lb sakei* est de 0,90 (Blickstad 1984).

Le tableau 6 représente le taux de croissance maximum pour les deux souches Tradi et Texel en réponse à la variation des facteurs pH, [NaCl], [acide lactique] et Aw.

Tableau 6: Valeurs codées des facteurs et réponses

Valeurs codées des facteurs					Réponses	
Milieu	pH	[NaCl]	[AL]	Aw	μ_{\max} Tradi	μ_{\max} Texel
1	1,000	0,000	0,000	0,00	0,171	0,126
2	-1,000	0,000	0,000	0,00	0,064	0,072
3	0,500	0,866	0,000	0,00	0,085	0,088
4	-0,500	-0,866	0,000	0,00	0,057	0,061
5	0,500	-0,866	0,000	0,00	0,055	0,054
6	-0,500	0,866	0,000	0,00	0,088	0,099
7	0,500	0,289	0,816	0,00	0,060	0,026
8	-0,500	-0,289	-0,816	0,00	0,227	0,055
9	0,500	-0,289	-0,816	0,00	0,524	0,199
10	0,000	0,577	-0,816	0,00	0,227	0,117
11	-0,500	0,289	0,816	0,00	0,062	0,064
12	0,000	-0,577	0,816	0,00	0,065	0,080
13	0,000	0,000	0,000	0,00	0,081	0,076
14	0,000	0,000	0,000	0,00	0,078	0,069
15	0,000	0,000	0,000	0,00	0,076	0,085
16	0,500	0,289	0,204	0,791	0,072	0,050
17	-0,500	-0,289	-0,204	-0,791	0,013	0,019
18	0,500	-0,289	-0,204	-0,791	0,090	0,087
19	0,000	0,577	-0,204	-0,791	0,049	0,098
20	0,000	0,000	0,612	-0,791	0,051	0,059
21	-0,500	0,289	0,204	0,791	0,090	0,081
22	0,000	-0,577	0,204	0,791	0,088	0,099
23	0,000	0,000	-0,612	0,791	0,296	0,090

[NaCl] en % (m/m) par rapport à la composition du syam

[AL] (Concentration en acide lactique) en g/l de syam

La variation des taux de croissance des deux souches peut être décrite par les modèles de régression :

$$Y_{\text{Tradi}} = 0,078 + 0,0565(\text{pH}) + 0,039(\text{pH})^2 - 0,0071(\text{NaCl}) - 0,017(\text{NaCl})^2 - 0,127(\text{AL}) + 0,113(\text{AL})^2 + 0,043(\text{Aw}) - 0,008(\text{Aw})^2 - 0,001(\text{pH} \times \text{NaCl}) - 0,149(\text{pH} \times \text{AL}) - 0,011(\text{pH} \times \text{Aw}) + 0,056(\text{NaCl} \times \text{AL}) - 0,032(\text{NaCl} \times \text{Aw}) - 0,052(\text{AL} \times \text{Aw})$$

$$Y_{\text{Texel}} = 0,077 + 0,023(\text{pH}) + 0,022(\text{pH})^2 + 0,007(\text{NaCl}) - 0,007(\text{NaCl})^2 - 0,029(\text{AL}) + 0,011(\text{AL})^2 + 0,007(\text{Aw}) - 0,008(\text{Aw})^2 - 0,002(\text{pH} \times \text{NaCl}) - 0,090(\text{pH} \times \text{AL}) - 0,026(\text{pH} \times \text{Aw}) - 0,020(\text{NaCl} \times \text{AL}) - 0,042(\text{NaCl} \times \text{Aw}) - 0,001(\text{AL} \times \text{Aw})$$

Les effets des facteurs ainsi que de leurs interactions sont données dans le tableau 7.

Tableau 7: Significativité des effets des facteurs et de leurs interactions

Coefficient	<i>Lb sakei</i> Tradi	<i>Lb sakei</i> Texel
Constante	0,079	0,077
Linéaire		
pH	0,056 ^{**}	0,023 ^{ns}
[NaCl]	-0,007 ^{ns}	0,009 ^{ns}
[AL]	-0,127 ^{****}	-0,036 ^{***}
Aw	0,043 ^{**}	0,009 ^{ns}
Quadratique		
pH	0,039 ^{ns}	0,022 ^{ns}
[NaCl]	-0,017 ^{ns}	-0,009 ^{ns}
[AL]	0,113 ^{***}	0,017 ^{ns}
Aw	-0,008 ^{ns}	-0,012 ^{ns}
Interactions		
pH ^ [NaCl]	-0,001 ^{ns}	-0,002 ^{ns}
pH ^ [AL]	-0,149 ^{***}	-0,111 ^{***}
pH ^ Aw	-0,011 ^{ns}	-0,033 ^{ns}
[NaCl] ^ [AL]	0,056 ^{ns}	-0,029 ^{ns}
[NaCl] ^ Aw	-0,032 ^{ns}	-0,061 ^{ns}
[AL] ^ Aw	-0,052 ^{ns}	0,002 ^{ns}

****, ***, **: coefficients significatifs à respectivement $P < 0.0001$, $P < 0.001$, $P < 0.01$
^{ns} : coefficient non significatif

$$R^2 (\text{Tradi}) = 0,92$$

$$R^2 (\text{Texel}) = 0,85$$

Le taux de croissance maximal de la souche Tradi est bien décrit par le model ($R^2=0,92$). Au seuil de 5 %, la concentration en acide lactique est la plus significative, avec un effet linéaire négatif prédominant renforcé par un effet quadratique. Cet effet quadratique démontre la pertinence du choix du réseau uniforme de Doelhert. L'effet linéaire négatif de la concentration en acide lactique traduit une baisse du taux de croissance lorsque cette concentration augmente. Le pH et l'Aw sont aussi des facteurs significatifs, avec des effets linéaires positifs, indiquant une augmentation de μ_{\max} à mesure que le pH évolue vers la valeur 6, ou que l'activité de l'eau augmente.

Aucun effet significatif de la concentration en NaCl sur le taux de croissance dans notre domaine d'étude n'a été observé. Ceci pourrait être expliquée par sa capacité à accumuler des substances osmoprotectrices comme la betaine (Chaillou et al. 2005). De plus, dans des conditions de concentration élevée en sel, *Lb sakei* utilise le sodium pour transporter certains produits du métabolisme. Les concentrations de 4 à 8 % de NaCl ne gêneraient donc pas de façon significative la croissance de cette souche.

L'interaction négative entre le pH et la concentration en acide lactique démontre un effet d'antagonisme entre ces deux facteurs. En effet, la surface de réponse (figure 9) illustrant cette interaction nous montre qu'entre les valeurs de pH 5 et 6, μ_{\max} baisse lorsque la concentration en acide lactique augmente. Mais pour des pH acides (entre 4 et 5), la souche

Tradi 313 se comporte différemment, car son μ_{\max} croît légèrement lorsque la concentration en acide lactique tend vers 60 g/l. Il serait donc possible que dans des conditions de pH acide, la souche Tradi 313 puisse utiliser l'acide lactique comme source d'énergie pour son métabolisme. Liu *et al.* (Liu 2003) affirment d'ailleurs que certaines bactéries lactiques, dont *Lb sakei* peuvent cataboliser le lactate sous certaines conditions.

$$\mu_{\max} \text{ Tradi} = 0,0631 + 0,0565 \cdot x - 0,155 \cdot y + 0,0501 \cdot x \cdot x - 0,1861 \cdot x \cdot y + 0,1935 \cdot y \cdot y$$

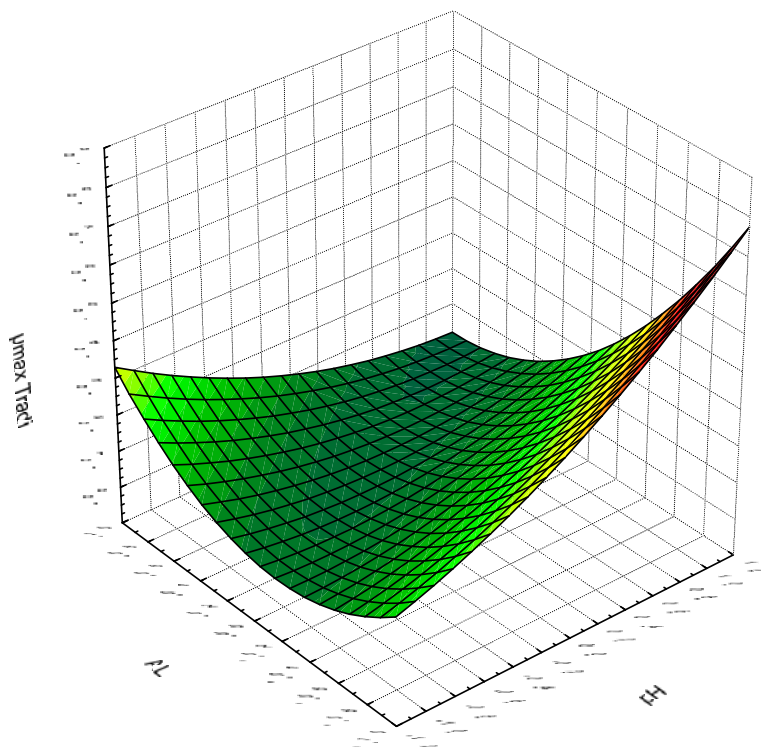


Figure 9: Effet d'interaction entre pH-[AL] pour *Lb sakei* Tradi

Concernant les résultats obtenus pour la souche Texel, la valeur du coefficient de détermination ($R^2=0,85$) démontre que le modèle n'explique pas parfaitement les évolutions observées. Seule une étude de tendance peut être menée. Si l'on se réfère au tableau 6, la concentration en acide lactique reste le facteur le plus significatif sur le μ_{\max} , avec un effet linéaire également négatif. De même que pour la souche Tradi 313, l'interaction entre pH et concentration en acide lactique démontre un effet d'antagonisme, c'est-à-dire que la présence de l'un diminue l'effet de l'autre sur la valeur de μ_{\max} .

Les résultats expérimentaux obtenus semblent cohérents avec les propriétés des bactéries lactiques. L'acide lactique est connu comme inhibiteur de croissance bactérienne à partir d'une certaine concentration, donc le fait d'augmenter sa concentration a pour effet de réduire le développement cellulaire des bactéries. De même, les bactéries lactiques ont des pH optimum de croissance voisin de la neutralité, donc forcément, l'évolution du pH vers l'acidité diminue la croissance. Enfin, comme tout microorganisme, *Lb sakei* se développe mieux dans un milieu à une A_w élevée (tendant vers 0,99) qu'à une A_w réduite.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors des différents tests pour la caractérisation biochimique des souches Tradi et Texel sont en accord avec données bibliographiques concernant l'identité des souches isolées des ferments. Les deux souches peuvent être identifiées comme appartenant à l'espèce *Lactobacillus sakei*. Des petites différences existent concernant leur phénotype mais elles sont parfaitement capables de fermenter les produits carnés et de survivre à la compétition avec d'autres bactéries. En effet, le glucose et le Ribose sont les principaux sucres présents dans la viande. Le premier provenant du glycogène du muscle et le second ayant pour origine l'hydrolyse de l'ATP. Lors de la fermentation des viandes, Le glucose s'épuise rapidement, et c'est le ribose qui constitue par la suite le principal substrat de la fermentation. Le fait de pouvoir cataboliser le ribose permet aux souches de *Lb sakei* de s'imposer face aux microorganismes présents qui ne possèdent pas cette propriété (Chaillou *et al.* 2005). La capacité de ces souches à fermenter d'autres types de sucres est un avantage qui permet souvent une croissance plus rapide et plus complète associée à une plus grande acidification de milieu fermenté et donc d'améliorer la qualité sanitaire et organoleptique des produits fermentés.

Le mélange des isomères D et L de l'acide lactique produite par la souche Texel à partir du glucose pourrait être expliquée par sa cinétique de croissance. En effet, d'après les résultats obtenus lors du suivi de l'acidité titrable, la souche Texel produit près de 8,2 g/l d'acide lactique au cours des 4 premières heures (croissance exponentielle) puis 9 g/l durant les 20 heures qui suivent. Si l'on se réfère à nos données bibliographiques (Lino *et al.* 2003a) selon lesquelles en présence d'acétate de sodium à 50 mM, l'activité L-LDH apparait au début de la phase de croissance exponentielle, et l'activité D-LDH commence à la fin de cette phase, le ratio des isomères de l'acide lactique obtenu dans notre cas peut être expliqué. La forme D produite à 90 % par la souche Tradi313 à partir de glucose pourrait être expliqué par une activité de D-LDH plus forte que l'activité L-LDH.

Ce travail nous a permis de déterminer les paramètres cinétiques des deux souches dans le milieu SYAM et de mettre au point des formulations complexes de ce milieu pour tester quatre paramètres physicochimiques capables de moduler la croissance des souches étudiées. Cette avancée nous a permis de réaliser un plan d'expérience complexe dont les résultats obtenus avec la souche Texel conduisent à deux hypothèses, soit cette souche est moins sensible aux variations du pH, et de l'Aw que la souche Tradi, et cela impliquerait que cette souche serait mieux adaptée à la fermentation de la viande telle que nous voulons la conduire d'autant plus qu'elle produit presque exclusivement du L lactate, soit l'erreur expérimentale est trop grande et masque les effets de ces paramètres. Les résultats des 3 répétitions au point central montrent des écarts qui militent vers la seconde hypothèse. Dans ces conditions, il serait nécessaire de refaire ces expérimentations pour diminuer les erreurs expérimentales et connaître les influences exactes des facteurs sur la croissance de la souche Texel. Ce travail sera réalisé dans le cadre d'une thèse qui débute en Octobre 2009, intitulée : Mise au point d'un procédé innovant de salaison de viande en conditions tropicales combinant une déshydratation imprégnation par immersion à une fermentation contrôlée. Evaluation de l'intérêt du procédé d'un point de vue sanitaire, nutritionnel et organoleptique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aasen IM, Møretrø ÁT, Katla ÁT, Axelsson ÁL, Storrø I (2000) Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:159-166
- Amanatidou A, Smid EJ, Bennik MHJ, Gorris LGM (2001) Antioxidative properties of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen concentrations. *FEMS Microbiology Letters* 203:87-94
- Ammor MS, Mayo B (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science* 76:138-146
- Ammor S, Dufour E, Zagorec M, Chaillou S, Chevallier I (2005a) Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology* 22:529-538
- Ammor S et al. (2005b) Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale producing traditional dry sausages. *Food Microbiology* 22:373-382
- Berg DJCVD et al. (1995) Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sakei* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2840-2844
- Blickstad E (1984) The effect of water activity on growth and end-product formation of two *Lactobacillus* spp. and *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509^T. *Applied Microbiology Technology* 19:13-17
- Bobllo M, Marshall VM (1992) Effect of acidic pH and salt on acid end-products by *Lactobacillus plantarum* in aerated, glucose-limited continuous culture. *Journal of Applied Bacteriology* 73:67-70
- Calderon M, Loiseau G, Guyot JP (2001) Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *Journal of Applied Microbiology* 90:508-516
- Catte M, Gancel F, Dzierzinski F, Tailliez R (1999) Effect of water activity, NaCl and smoke concentrations on the growth of *Lactobacillus plantarum* ATCC 12315. *International Journal of Food Microbiology* 52:105-108
- Chaillou S et al. (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology* 23:1527-1533
- Champagne CP, Garnder N, Doyon G (1989) Production of *Leuconostoc oenos* Biomass under pH Control. *Applied and Environmental Microbiology* 55:2488-2492
- Champomier M-C, Montel M-C, Grimont F, Grimont PAD (1987) Genomic identification of meat lactobacilli as *Lactobacillus sakei*. *Annales de l'Institut Pasteur-Microbiologie* 138:751-758
- Champomier-Verges M-C, S.Chaillou, M. Cornet, and M. Zagorec (2002) Erratum to *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Research in Microbiology* 153:115-123
- Collignan A, Raoult-Wack AL (1992) Dewatering through immersion in sugar/salt concentrated solutions at low temperature. An interesting alternative for animal foodstuffs stabilization. In : Mujumdar Arun S.. *Drying 92. Part A, part B*. London : Elsevier:1887-1898
- Condon S (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters* 46:269 - 280

- Dellaglio H, Roissart HD, Torriani S, Curk MC, Jansen D (1994) Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: De Roissart H., Luquet F.M., (Eds), Les bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Loriga, Uriage. 25-116
- Demeyer D et al. (2000) Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. Food Research International 33:171-180
- Desmazeau MJ, Roissart Hd (1994) Métabolisme général des bactéries lactiques. in Bactéries Lactiques. Edition Loriga 1:169-205
- Divies C, Frey L, Hubert JC, Roissart Hd (1994) Métabolisme d'autres substrats carbonés par les bactéries lactiques. in Bactéries Lactiques. Edition Loriga 1:291-305
- Garrity GM, Holt JG (2001) Taxonomic Outline of Archaea and Bacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1:155-166
- Goffin P et al. (2005) Lactate Racemization as a Rescue Pathway for Supplying D-Lactate to the Cell Wall Biosynthesis Machinery in *Lactobacillus plantarum*. Journal of Bacteriology 187:6750-6761
- Guyot JP, Calderon M, Morlon-Guyot J (2000) Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. Journal of Applied Microbiology 88:167-182
- Hino T, S.Kuroda (1993) Presence of Lactate Dehydrogenase and Lactate Racemase in *Megasphaera elsdenii* Grown on Glucose or Lactate. Applied and Environmental Microbiology 59:255-259
- Holck A, Axelsson L, Birkeland SE, Aukrust T, Blom H (1992) Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706". Journal of Genetic and Microbiology 138:2715-2720.
- Knauf HJ, Vogel RF, Hammes WP (1992) Cloning, Sequence, and Phenotypic Expression of *katA*, Which encodes the Catalase of *Lactobacillus sake* LTH677. Applied and Environmental Microbiology 58:832-839
- Lino T, A. Manome, S. Okada, T. Uchimura, and K. Komagata (2001) Effects of sodium acetate on the production of stereoisomers of lactic acid by *Lactobacillus sakei* and other lactic acid bacteria. Journal of Genetic and Applied Microbiology 47:223-239
- Lino T, T.Uchimura, Komagata K (2002) The effect of sodium acetate on the growth yield, the production of L- and D-lactic acid, and the activity of some enzymes of the glycolytic pathway of *Lactobacillus sakei* NRIC 1071T and *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067T. Journal of Genetic and Applied Microbiology 48:91-102
- Lino T, T.Uchimura, Komagata K (2003a) The effect of sodium acetate on the activity of L- and D-lactate dehydrogenases in *Lactobacillus sakei* NRIC 1071 and other lactic acid bacteria. Journal of Genetic Applied Microbiology 5:49-51
- Lino T, Uchimura T, Komagata K (2003b) Characterization of *Lactobacillus sakei* by the type of stereoisomers of lactic acid produced. Journal of Genetic Applied Microbiology 49:111-121
- Liu S-Q (2003) Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. International Journal of Food Microbiology 83:115-131
- Liu SQ, Asmundson RV, Gop PK, R.Holland, Crow VL (1998) Influence of Reduced Water Activity on Lactose Metabolism by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* at Different pH Values. Applied and Environmental Microbiology 64:2111-2116
- Maicas S, Ferrer S, Pardo I (2002) NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. Microbiology 148:325-332
- Mataragasa M, Metaxopoulou J, Galiotoub M, Drosinos EH (2003) Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Science 64:265-271

- McLeod A, O.L.Nyquistb, Snipen L, Naterstada K, Axelssona L (2008) Diversity of *Lactobacillus sakei* strains Investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology* 31:393-403
- Montel MC, Masson F, Talon R (1998) Bacterial Role in Flavour Development. *Meat Science* 49:111-123
- Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P (2003) Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science* 65:859-867
- Quaranta J (2007) Etude de la fermentation d'une viande maigre après un traitement de deshydratation-impregnation par immersion. Stage Ingenieur de L'INSFA
- Rhee SK, Pack MY (1980) Effect of Environmental pH on Fermentation Balance of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology* 144:217-221
- Roissart H, Luquet FM (1994) Bactéries lactiques. Aspect fondamentaux et technologiques. Editeur Loriga France 2:614p /ISSN/EAN : 612-950747-950770-950741
- Rovira A, Nieto JC, Rodríguez A, Reguera JI, González Z (1997) Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. *Microbiologia* 13:201-208
- Santo MLPE, Beirao LH, Sant'Anna ES, Dalcin EB, Franco BGM (2003) Bactériocinogenic effect of *Lactobacillus sakei* 2a on microbiological quality of fermented *Sardinella Brasiliensi*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46:553-5561
- Thomas TD, Ellwood DC, Longyear VMC (1979) Change from Homo- to Heterolactic Fermentation by *Streptococcus lactis* Resulting from Glucose Limitation in Anaerobic Chemostat Cultures. *Journal of bacteriology* 138:109-117
- Torrino MI, Taranto MP, Sesma F, Valdez GFd (2001) Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH M. *Journal of Applied Microbiology* 91:846-852
- Yoo I-K, Chang HN, E.G.Lee, Chang YK, Moon S-H (1997) By-product formation in cell-recycled continuous culture of *Lactobacillus casei*. *Biotechnology Letters* 19:237-240
- Zagorec M, Chaillou S, Champomier-Verges MC, Crutz-le-Coq AM (2006) Du Genome de *Lactobacillus sakei* à la bioconservation des produits carnés. *Viandes et Produits Carnés* 25:91-94

RESUMÉ

L'UMR Qualisud au sein du département PERSYST du CIRAD cherche à adapter le procédé de fermentation/séchage aux conditions tropicales permettant ainsi d'améliorer la qualité des produits fermentés/séchés (ou susceptibles de l'être) et d'ouvrir une nouvelle voie de valorisation de la viande en milieu tropical. Une solution innovante est envisagée qui consiste à préstabiliser par déshydratation et à formuler rapidement la viande avant fermentation par immersion en solution concentrée en particulier en glucides. Pour ce faire, il est envisagé de coupler un traitement de déshydratation imprégnation par immersion et une étape de fermentation lactique.

La déshydratation imprégnation par immersion en solution ternaire eau-sel-glucides permet d'éviter le séquençage des opérations de salage et de séchage. L'utilisation de sirop de glucose (amidon partiellement hydrolysé) induit une bonne déshydratation tout en limitant le salage du produit. Les deux paramètres importants sont l'activité de l'eau (aw) faible et la teneur en NaCl qui inhibent la croissance des flores négatives. La fermentation lactique sera conduite par des souches de *Lactobacillus sakei* commerciales pour leur capacité à acidifier rapidement le milieu.

L'intérêt de ce couplage est que la DII permet de préstabiliser rapidement la viande en abaissant l'activité de l'eau par déshydratation osmotique, en salant la viande et à maintenir dans la viande des quantités de sucres fermentescibles nécessaires au bon déroulement de la fermentation lactique. La fermentation qui s'ensuit permettra d'améliorer non seulement la qualité sanitaire en abaissant le pH et en produisant des acides organiques et autres composés antimicrobiens capables d'inhiber le développement des flores négatives, mais aussi la qualité organoleptique en libérant des précurseurs d'arômes générés par des activités enzymatiques bactériennes.

Les travaux menés font suite à des travaux de recherche qui ont déjà permis de confirmer la faisabilité du couplage. Ils visent à approfondir la connaissance des propriétés de deux souches *Lb sakei* commerciales et leur comportement dans un environnement modèle proche de celui de la viande après DII. Les souches de *Lb sakei* ont été isolées à partir des ferments commerciaux, puis leur profil d'assimilation de glucides et leur potentiel enzymatique ont été déterminés. Leurs paramètres cinétiques de croissance ont été mesurés dans un milieu liquide semi-synthétique. Pour finir les effets des paramètres pH, concentration en NaCl, concentration acide lactique et activité de l'eau, ainsi que de leurs interactions sur la croissance des deux souches ont été mesurés étudiés à l'aide d'un réseau uniforme de Doelhart. Le choix des valeurs des facteurs du plan d'expérience est basé sur les caractéristiques physico-chimiques des viandes ayant subi un traitement de DII. Les résultats obtenus permettent de valider le choix des souches utilisées et d'apporter des éléments de connaissance pour la mise en place d'expérimentations contrôlées afin de modéliser le procédé proposé.

ABSTRACT

The UMR Qualisud within the PERSYST Department of CIRAD seeks to adapt the fermentation / drying process to tropical conditions, improving fermented / dried product quality and open a new path recovery of meat in tropical environments. An innovative solution is proposed which involves to first stabilize by dehydration and to provide timely meat before fermentation by soaking in concentrated solution in particular carbohydrates. To do this, it is proposed to combine treatment of dehydration and impregnation by soaking to step of lactic fermentation.

Dehydration impregnation by soaking in ternary solution water-salt-carbohydrate avoids the sequencing of salting and drying. The use of glucose syrup (partially hydrolyzed starch) induces a good dehydration while limiting salt product. The two important parameters are the water activity (a_w) and low content of NaCl that inhibit the growth of negative flora. The lactic fermentation will be carried by commercial strains of *Lactobacillus sakei* for their ability to rapidly acidify the medium.

The advantage of this coupling is that the DIS allows prestabilizing meat quickly by lowering the water activity by osmotic dehydration, salting the meat, and keeping it in fermentable sugar quantities necessary for the proper conduct of the lactic fermentation. The fermentation follows will not only improve health quality by lowering the pH in producing organic acids and other antimicrobial compounds that inhibit the development of negative flora, but also the organoleptic quality by releasing precursors of aromas generated by bacterial enzyme activities.

The work is in continuation of research that has already confirmed the feasibility of coupling. They aim to increase knowledge of the properties of two commercial strains of *Lb sakei* and behaviour in a model similar to that of the meat after DIS. The *Lb sakei* strains were isolated from commercial yeast, and their carbohydrates profile assimilation and enzymatic potential were determined. Their growth kinetics was measured in a semi-synthetic liquid. Finally the effects of the parameters pH, NaCl concentration, lactic acid concentration and water activity, and their interactions on growth of the two strains here studied were measured using a uniform network of Doelhart. The choice of factor values of experimental design is based on the physico-chemical properties of meat after DIS treatment. Results can validate the choice of strains used and provide some knowledge for the development of controlled experiments to model the proposed process.